

CARACTERIZAÇÃO DE VARIEDADES DE LARANJA DOCE QUANTO AO NÚMERO DE SEMENTES E A TAXA DE POLIEMBRIONIA DE SEMENTES

TATIANE CUNHA¹; RENATA M. LANZA²; RODRIGO R. LATADO³

Nº 10137

RESUMO

A instalação de programas de melhoramento de laranjeiras com uso de cruzamentos controlados é dificultada principalmente pelos problemas de poliembrionia nas sementes e pela presença de ciclo juvenil longo nas plantas, o que ocasiona muito tempo para a conclusão de um ciclo de recombinação e seleção. Visando a seleção de variedades de laranjeiras doces que possuam potencial para serem usadas como genitoras em cruzamentos controlados, foram avaliadas durante o ano de 2009, o número médio de sementes por fruto, o número médio de embriões por semente e a taxa de poliembrionia em sementes, de 536 acessos do Banco de Germoplasma de Citros do IAC. As variedades que se destacaram quanto a baixa taxa de poliembrionia nas sementes foram as laranjeiras: Dierberger-9, Amber Sweet e Pêra de Abril, sendo que a Pêra de Abril apresentou baixo número de sementes por fruto mas alta porcentagem de plantas zigóticas após a germinação de sementes. Já a laranjeira Dierberger-9 apresentou frutos com grande número de sementes.

ABSTRACT

The plant breeding programs is sweet oranges using controlled crosses is hampered mainly by the by the existence of varieties with polyembryonic seeds and with long juvenile cycle, that results in a long time for the execution of each cycle of recombination and selection. In 2009, we assessed the average number of seeds per fruit, the average number of embryos per seed and the polyembryony rate in seeds of 536 accessions from the Citrus Germplasm Bank / IAC in order to select varieties of sweet oranges which have potential to be used as mother genitor in controlled crosses. The varieties that showed seeds with low polyembryony rate were Dierberger-9, Amber Sweet Pera de abril. This variety showed a low number of seeds per fruit but with high percentage of zygotic seedlings, after germination. Dierberger-9 was the variety that showed fruits with lower seeds number.

¹ Centro Universitário Hermínio Ometto/UNIARARAS, taticunha1989@hotmail.com

² Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP

³ Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC

INTRODUÇÃO

A poliembrionia é definida como o desenvolvimento de dois ou mais embriões em uma única semente. A maioria das plantas cítricas é considerada como poliembriônica por produzir sementes contendo geralmente um embrião zigótico e outros, de origem apomítica, a partir do tecido nucelar do saco embrionário (Dorneles, 1977).

Para Frost & Soost (1968), o número de embriões contidos em uma semente é variável sendo influenciado pela cultivar, pela nutrição do fruto, pela cultivar polinizadora e por fatores ambientais, mas apenas três ou quatro possuem vigor para a germinação e a emergência, por competirem por espaço e nutrientes. Sendo assim, o número final de embriões (nucelares ou zigóticos) presentes numa mesma semente varia em função do número inicial de embriões nucelares, tempo de início do seu desenvolvimento, localização, herança paternal e vigor genético dos dois tipos de embriões (Frost, 1926).

A principal desvantagem da poliembrionia se refere à dificuldade de obtenção e detecção de híbridos em programas de melhoramento via hibridação sexual, uma vez que os embriões nucelares, geralmente em maior número e mais vigorosos, competem com o embrião zigótico e podem suprimi-lo (Frost & Soost, 1968). Deste modo, o uso de progenitores maternos poliembriônicos em cruzamentos em citros geralmente é indesejável por resultar na obtenção de progênies contendo um pequeno número (ou nenhuma) de plantas híbridas.

O Centro APTA Citros Sylvio Moreira possui um programa de melhoramento de citros com uso de cruzamentos que foi iniciado em 1993 com a realização de cruzamentos interespecíficos e intraespecíficos entre tangerinas, laranjas e outras espécies cítricas. Uma dificuldade para a realização de cruzamentos controlados entre laranjas doces é a dificuldade de se encontrar variedades monoembriônicas que possam ser usadas como progenitoras femininas, devido a elevada taxa de poliembrionia de sementes observada na maioria das variedades comerciais.

Uma das formas mais atuais de se verificar a origem zigótica de plantas cítricas obtidas por sementes é com o uso da técnica de marcadores moleculares. Nesta, o perfil eletroforético do DNA (após a reação de PCR) das plantas a serem testadas (das progênies) é comparado com o da planta-mãe em busca de diferenças entre ambos. A observação de diferenças entre estes perfis moleculares demonstra a natureza híbrida da planta testada.

O objetivo deste estudo foi caracterizar os 536 acessos de laranjas doces quanto ao número médio de sementes presentes nos frutos, número médio de embriões por semente, a taxa de poliembrionia de sementes, assim como a

porcentagem de embriões zigóticos presentes em sementes germinadas, de forma a se identificar variedades de laranjeira com potencial para serem utilizadas como progenitoras femininas em programas de melhoramento por cruzamento.

MATERIAL E MÉTODOS

No ano de 2009 foram avaliados 536 acessos de laranjeiras doces do Banco de Germoplasma do Centro Apta Citros Sylvio Moreira/IAC (BAG-Citros), procedendo-se as avaliações de número de sementes em 12 frutos, número de embriões de 20 sementes, a taxa de poliembrionia de sementes e a porcentagem de embriões zigóticos em sementes germinadas (de seis variedades altamente monoembriônicas), este último utilizando-se o método de marcadores moleculares TRAP's.

As sementes, extraídas de cada fruto maduro, foram contadas, lavadas com cal hidratada para retirada da mucilagem, e secas a temperatura ambiente. A contagem de seus cotilédones foi feita no Laboratório de melhoramento genético do Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC com a retirada da testa e do tégmen, seguido da contagem de cotilédones visíveis em cada semente e correlacionando estes dados com o número de embriões. O número de embriões correspondia à metade do número de cotilédones contados.

A taxa de poliembrionia foi estimada pela relação entre o número de sementes com mais de um embrião, no total de sementes avaliadas, semelhantemente ao citado por Moreira & Gurgel (1941).

Em seguida, todos os dados foram plotados em planilha eletrônica excel e calculou-se o número médio de sementes por fruto e o desvio padrão da média de cada variedade, assim como o número médio de embriões por semente e o respectivo desvio padrão da média. Realizou-se para cada variedade o cálculo da taxa de poliembrionia de sementes, expresso como a porcentagem de sementes poliembriônicas no total de sementes avaliadas.

Os dados de número médio de sementes por fruto e de número médio de embriões por semente foram analisados estatisticamente com uso do programa SAS (Sas system for windows v6.11), procedimento GLM, em delineamento inteiramente casualizado, realizando os testes F e o Tukey, a 5% de probabilidade.

Para a determinação da porcentagem de plantas zigóticas foram semeadas 50 sementes de cada variedade de laranjeira (seis variedades). Após 60 dias, cada tubete foi avaliado individualmente com a contagem do número de plântulas emergidas, sendo possível determinar a taxa de poliembrionia pelo método de germinação de sementes.

A planta mais vigorosa de cada tubete foi utilizada no experimento de identificação de plantas zigóticas com uso de marcadores moleculares TRAPs, sendo utilizadas 30 plântulas de cada uma das seis variedades de laranjeiras [Lanceta amarga (CV49); Agrodoce (CV125); Pêra de Abril (CV148); Feijão-cru (CN07); Grosse sanguine (CN72) e Amber sweet (CN1428)].

Os DNA's genômicos de cada planta foram extraídos de acordo com Machado et al. (1996). As reações de PCR foram realizadas em volume de 12,5 µL contendo DNA molde (30-50 ng µL⁻¹), tampão Taq (1X), MgCl₂ (25 mM), dNTPs (2,5 mM de cada), primers arbitrários e fixos (10 µM) e Taq DNA polimerase (0,5 U). O programa para a amplificação foi composto por um ciclo de 94°C/2min.; seguido de 5 ciclos de 94°C/45s, 35°C/45s e 72°C/1min; 35 ciclos de 94°C/45s, 50°C/45s e 72°C/1min; e um ciclo final de 72°C/7min.

Após as reações de amplificação, 12,5µL de tampão de desnaturação [10mL formamida, 0,001mg azul bromofenol, 0,001mg xilenocianol e 200µL EDTA 0,5M pH 8,0] foram adicionadas à cada reação, seguido de desnaturação à 94°C/3min. A eletroforese foi realizada em gel de seqüenciamento, com poliacrilamida denaturante à 5%, com potência constante (1.100V) por 2 h, em cuba vertical. Os géis foram revelados pelo método de nitrato de prata.

As plantas zigóticas foram identificadas comparando-se os padrões de bandas resultantes dos PCR com os DNA's de cada planta, em comparação com os PCR com uso dos DNA's das respectivas plantas matrizes. Foram consideradas como plantas híbridas aquelas que possuíam padrão diferente da planta-matriz em pelo menos um par de primers, tendo sido testado três pares de primers (07F-P3, 03R-P2 e 07R-P4). A porcentagem de embriões zigóticos de cada população foi expressa pela razão entre o número de embriões zigóticos observados e o total de plantas avaliadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no ano de 2009 apresentaram 19 variedades com taxa de poliembrião variando entre 0 e 30%. Entre estas variedades, os números médios de sementes variaram entre 2,3 e 16,8, com destaque para as variedades Dierberger-9, com média de 11,3 sementes e 0% de poliembrião, e a variedade Santa Lúcia, com 16,8 sementes e 15% de poliembrião. As variedades Amber Sweet e Pêra de Abril também apresentaram 0% de taxa de poliembrião nas sementes, mas com número médio de sementes de 7,6 e 2,7, respectivamente. Neste mesmo grupo de variedades, o número médio de embriões por semente variou entre 1,0 ± 0,0 e 1,35 ± 0,9.

Na literatura não há citações da existência de variedades monoembriônicas de laranja doce (Frost & Soost, 1968 e Prates, 1977). Já Domingues et al. (1996) estudaram 44 variedades pertencentes aos principais grupos de laranjas doces: com acidez (como a laranja Pêra), com baixa acidez (como a Lima), de umbigo (como a Bahia) e sangüíneas (como a Rubi Blood) quanto à taxa de poliembria pelos métodos de contagem direta de embriões e de germinação de sementes em telado e in vitro. Segundo estes autores, a maioria das variedades de laranjeiras apresentou poliembria média a elevada para os três métodos de estudo utilizados e apenas a variedade Pêra de Abril foi considerada como monoembriônica.

Analisando-se todos os 536 acessos quanto às taxas de poliembria em sementes pôde-se observar 19 acessos com sementes com poliembria entre 0 e 30%, 112 acessos com taxas de poliembria entre 31 e 60% e o restante (405), com taxas acima de 60%. Este resultado está de acordo com o citado por Moreira et al. (1947) que afirmou que a maioria das variedades de laranja doce apresenta sementes com altas taxas de poliembria. Com relação ao número médio de sementes por fruto, os valores obtidos variaram entre 40,3 e 0 sementes, com menores valores geralmente observados nas laranjas de umbigo (tipo Bahias).

Os valores observados para o número médio de embriões por sementes em todas as variedades de laranja doce avaliadas variaram entre 1,0 e 5,35 embriões, com destaque para as laranjas Pêra de abril, Dierberger-9 e Amber Sweet, que apresentaram as 20 sementes contendo apenas um embrião cada.

De maneira geral, como seria esperado, as taxas de poliembria observadas no método de observação em sementes germinadas foi geralmente menor do que as observadas no método de contagem de cotilédones em sementes (correlacionado com embriões). Isto pode ser explicado pelo fato de que nem todos os embriões presentes numa mesma semente conseguem germinar e emergir.

Nas avaliações de identificação de embriões zigóticos com uso de marcadores moleculares TRAP's em seis variedades que apresentavam baixas taxas de poliembria, a variedade Pêra de Abril foi a que apresentou a maior porcentagem de plantas de origem zigótica (60,7%), seguido da laranja Feijão-cru (35,1%) e Grosse sanguine (34,4%), sendo que a apresentou a menor porcentagem foi a laranja Agrodoce, com 2,3% de plantas zigóticas.

CONCLUSÃO

As variedades que se destacaram quanto a baixa taxa de poliembria nas sementes foram as laranjeiras: Dierberger-9, Amber Sweet e Pêra de Abril, sendo que a Pêra de Abril apresentou baixo número de sementes por fruto mas alta porcentagem

de plantas zigóticas após a germinação de sementes. Já a laranjeira Dierberger-9 apresentou frutos com grande número de sementes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DOMINGUES, E.T.; TULMANN NETO, A.; MACHADO, M.A.; TEÓFILO SOBRINHO, J. & FINA, B.G. Estudo da poliembrionia em laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck). In: ENCONTRO CIENTÍFICO DOS PÓS-GRADUANDOS, 2., Piracicaba, 1996. Anais. Piracicaba, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, USP, 1996c. p.6.
- DORNELLES, C. M. M. Laranja Tobias Cultivar Promissora para a Indústria de Sucos. In CONG. BRAS. FRUTICULTURA, 04, 1977, Salvador, Anais... Salvador: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1977. p 369.
- FROST, H.B. *Polyembryony, heterozygosis and chimeras in Citrus*. Hilgardia, I (16): 365-402, 1926.
- FROST. H.B. & SOOST, R.K. Seed reproduction: development of gametes and embryos. In: Reuther, Batchelor and Webber (ed.) *The Citrus industry*, Univ. Calif. Press, Berkeley, 2 : 290-324, 1968.
- MACHADO, M. A.; COLETTA FILHO, H. D.; TARGON, M. L. N.; POMPEU JUNIOR, J. *Genetic relationship of Mediterranean mandarins (Citrus deliciosa Tenore) using RAPD markers*. Euphytica, Wageningen, v. 92, p. 321-326, 1996.
- MOREIRA & GURGEL, J.T.A. A fertilidade do pólen e sua correlação com o número de sementes, em espécies e formas do gênero *Citrus*. *Bragantia*, Campinas, I 669-711, 1941.
- MOREIRA, S.; GURGEL, J.T.A. & ARRUDA, L.F. Poliembrionia em *Citrus*. *Bragantia*, Campinas, 7(3): 69-105, 1947.
- PRATES, H.S. Poliembrionia em citros. Jaboticabal, 1977. 41p. Monografia - UNESP, 1977.

AGRADECIMENTOS

- CNPq - PIBIC e FAPESP, pelas bolsas de estudo de IC.
- Ao Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC, pela oportunidade de estágio.